Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. R. Bierich

Vergleichende Untersuchungen über die Heinzkörperbildung in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Andreas Bernau
aus Walsleben

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0075

Aus der Kinderklinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. J. R. Bierich

Vergleichende Untersuchungen über die Heinzkörperbildung in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Andreas Bernau
aus Walsleben

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Mayer

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kleihauer

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. D. Waller

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung 1

1.1 Fragestellung 3

2. Material und Methodik 4

2.1 Untersuchungsgut 4

2.11 Blutproben für Versuche zur Ermittlung grundsätzlicher Bedingungen der Heinzkörperbildung

2.12 Blutproben für Versuche an Erythrozyten von Neugeborenen vor und nach Austauschtransfusion

2.13 Reagentien

2.2 Methodik 5

2.21 Prinzipielle Versuchsanordnung (Standardversuch)

2.22 Einzelne Methoden

3. Versuchsergebnisse 9

3.1 Ergebnisse zur Methodik 9

3.11 Heinzkörperbildung während der Inkubation mit Nilblausulfat

3.12 Verfahren zur quantitativen Auswertung der Heinzkörperpräparate

3.13 Schlußfolgerung aus den Ergebnissen zur Methodik

3.2 Versuchsergebnisse über die Bedingungen der Heinzkörperbildung 11

3.21 Verhalten der H.-Ionenkonzentration

3.22 Entwicklung der H.-Ionenkonzentration bei unterschiedlichen Ausgangswerten

Seite

3.23 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der H.-Ionenkonzentration

3.24 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Sauerstoffkonzentration

3.25 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Inkubationsdauer und der APH-Konzentration

3.26 Einfluß von EDTA-Zusatz auf die Heinzkörperbildung

3.3 Heinzkörperbildung in Erythrozyten vor und nach Austauschtransfusion 18

3.4 Tabellen 20

4. Diskussion 27

5. Zusammenfassung 33

6. Literaturverzeichnis 34

1. EINLEITUNG

Die nach ROBERT HEINZ (1890) benannten intraerythrozytären Innenkörper wurden schon früher mehrfach beobachtet (MARCHAND 1879; RIESS 1882; LEWIN 1889; Literaturübersicht bei WEBSTER 1949). HEINZ fand sie bei verschiedenen Warmblütern nach Einwirkung von Phenylhydrazin und seinen Derivaten. Er entdeckte die charakteristische Färbbarkeit durch Methylviolett und gab eine genaue Beschreibung der Innenkörper, die er als den Blutkörperchen meist knopfförmig aufsitzende, stark lichtbrechende Kugeln beschrieb. HEINZ vermutete, daß diese "farbstoffgierigen Kugeln durch das Phenylhydrazin abgetödtetes Protoplasma" darstellten, "das von den rothen Blutkörperchen ausgestoßen wird".

Durch jüngere elektronenmikroskopische Untersuchungen (JUNG 1947; KÜNZER, SCHÜTZ u. BENSCH 1960; SCHÜTZ u. KÜNZER 1961; BORGES u. DESFORGES 1967) wurde dagegen übereinstimmend festgestellt:

1. Heinzkörper sind stets echte intraerythrozytäre Elemente, die in enger räumlicher Beziehung zur Membran stehen.
2. Größe und Gestalt der Innenkörper sind von Fall zu Fall verschieden, wobei eine Beziehung zum Grad der Schädigung besteht und gewisse morphologische Eigentümlichkeiten bei verschiedenen Giftstoffen vorherrschen.
3. Die Membran wird nicht sichtbar verändert oder eingezogen, ausgestülpt oder bläschenartig abgeschnürt. Bei schwerer Schädigung wird die Membran aufgerissen, wobei es zum Austreten von Heinzkörpern aus dem Zellinnern kommen kann.

Es besteht eine starke morphologische Ähnlichkeit der nach Phenylhydrazin beim Menschen und bei verschiedenen Laboratoriumstieren festgestellten Zellschädigung (WOLPERS 1941; JUNG 1947; ROTHBERG, CORALLO u. CROSBY 1959; RIFKIND 1965). Bezüglich des biochemischen Entstehungs-

mechanismus der Heinzkörper wird überwiegend anerkannt, daß sie sich aus oxydativ denaturiertem Hämoglobin bilden. Dies wurde durch die Erzeugung ähnlicher Präzipitate an stromafreien Hämoglobinlösungen wahrscheinlich gemacht (JANDL, ENGLE u. ALLEN 1960) und durch den Nachweis identischer Peptidmuster bei Hämoglobin Zürich und den in den Erythrozyten dieser Anomalieträger gebildeten Innenkörper bewiesen (BACHMANN u. MARTI 1962). Heinzkörper bestehen danach aus denaturiertem Globin und Oxydationsprodukten des Hämanteiles, wobei über die Denaturierungsvorgänge am Globinmolekül brauchbare Vorstellungen entwickelt wurden (JANDL, ENGLE u. ALLEN 1960; ALLEN u. JANDL 1961; WALLER u. LÖHR 1963; KUSUMOTO u. NAKAJIMA 1967; JACOB, BRAIN et al. 1968). Dagegen ist der Ablauf in einzelnen Teilschritten mit Einbeziehung des Hämanteiles noch weitgehend ungeklärt (JANDL, ENGLE u. ALLEN 1960; GOLDSTEIN, HAMMAKER u. SCHMID 1968; RENTSCH 1968). Besonders bestehen auch kontroverse Anschauungen über die Bedeutung des Methämoglobins für die Heinzkörperbildung (JUNG 1954; MAGOS u. SZIZA 1959; HARLEY u. MAURER 1961; BEUTLER 1962; BEUTLER u. BALUDA 1962).

Frühere Untersuchungen, die der Zellmembran eine vorrangige Bedeutung für die Heinzkörperbildung einräumten, sind noch nicht eindeutig widerlegt (GASSER 1954; JUNG 1954; KÜNZER u. SCHÜTZ 1956).

Aus klinischen Beobachtungen (WILLI 1947; GASSER u. KARRER 1948; GASSER 1953) und anschließend durchgeführten systematischen Studien (WILLI u. HARTMEIER 1950; BROWN u. BUQUIR 1961) geht hervor, daß Erythrozyten von Neugeborenen, und insbesondere von Frühgeborenen, in den ersten Lebenswochen eine erhöhte Neigung zur spontanen Heinzkörperbildung haben. Diese charakteristische Eigenschaft der Neugeborenenerythrozyten wurde auch experimentell belegt und später mehrfach bestätigt (KÜNZER, AMBS u. SCHNEIDER 1954; VEST 1958; TJOA 1960; BETKE 1961; ULUKUTLU, KLEIHAUER u. BETKE 1966; BORGES u. DESFORGES 1967). Durch diese erhöhte Heinzkörperempfindlichkeit können bei Anwendung bestimmter schädlicher Stoffe (Vitamin K-Analoge, Resorcin, Sufonamide, Guajacol, Naphthalin u.a.) toxische Innenkörperanämien aus-

gelöst werden (DAWSON, THAYER u. DESFORGES 1958; BETKE 1961; GASSER 1954; BETKE u. SCHALL 1958; VALAES 1963; HANSSLER 1964; IRLE 1964; RITTER u. SCHULZE 1970). Eine befriedigende Klärung der erhöhten Heinzkörperempfindlichkeit der Erythrozyten Neugeborener gelang bis dahin nicht.

1.1 FRAGESTELLUNG

Da systematische Untersuchungen über die Heinzkörperbildung unter verschiedenen in vitro Bedingungen nur für Erwachsenenerythrozyten vorliegen (WALLER u. LÖHR 1963), war es primäre Aufgabe der vorliegenden Arbeit, entsprechende Untersuchungen vergleichend an Erythrozyten von Neugeborenen und Erwachsenen durchzuführen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden dann Blutproben von Neugeborenen vor und nach Austauschtransfusion auf ihre Heinzkörperempfindlichkeit hin untersucht. Diese Fragestellung war angeregt durch eine klinische Beobachtung von IRLE (1964), wonach Frühgeborene nach Austauschtransfusion unter der Inhalationsbehandlung mit naphthalinhaltigen Medikamenten Innenkörperanämien entwickelt hatten. Es sollte dabei in diesem Zusammenhang geprüft werden, ob Spendererythrozyten von Erwachsenen nach einer Austauschtransfusion im Kreislauf von Neugeborenen eine experimentell veränderte Heinzkörperempfindlichkeit erfahren. Prinzipiell könnte damit auch die Frage angegangen werden, ob Eigenschaften von Erythrozyten durch Änderung des in vivo Milieus (Erwachsenenerythrozyten im Kreislauf Neugeborener) veränderbar sind.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 UNTERSUCHUNGSGUT

2.11 Blutproben für Versuche zur Ermittlung grundsätzlicher Bedingungen der Heinzkörperbildung

Menschliches Neugeborenen- (Nabelschnur-)[+)] und Erwachsenenblut wurde durch Zusatz von 1/10 Volumen 3.8%igem Natriumzitrat ungerinnbar gemacht und sofort nach Entnahme weiter verarbeitet.

2.12 Blutproben für Versuche an Erythrozyten von Neugeborenen vor und nach Austauschtransfusion

Die Proben wurden Neugeborenen aus der Nabelvene über einen liegenden Katheter vor und nach Austauschtransfusion entnommen. Als Vergleichs- und Bezugswert für spätere Verlaufskontrollen wurde neben dem jeweiligen Spenderblut eine Erwachsenenblutprobe verwendet, die zu den gleichen Zeiten aus der Konserve bzw. venös entnommen wurde. Als Erwachsenenkontrollblut diente stets das Blut des Untersuchers wegen der wünschenswerten Konstanz des Bezugswertes. Da das Konservenblut im Verhältnis 1 : 5 mit einem ACD-Stabilisator versetzt war, wurden vor Versuchsbeginn dem Neugeborenenblut und der Erwachsenenkontrolle dieser Stabilisator im gleichen Verhältnis zugefügt.

[+)] Ich danke Herrn Professor Dr. ROEMER, Direktor der Universitätsfrauenklinik Tübingen, für die Überlassung des Nabelschnurblutes der Neugeborenen.

2.13 Reagentien

2.131 Beta-Acetylphenylhydrazin-Lösung (β-APH)

Eine 1 g-%ige β-APH-Lösung (BEUTLER, DERN u. ALVING 1955) wurde durch Auflösen von 1 g APH in 88 Teilen Pufferlösung (s. 2.132) und 12 Teilen 0.9%igem Kochsalz hergestellt. Die anschließend im Kühlschrank aufbewahrte Lösung fand stets nur 3 Tage Verwendung.

2.132 Isotonische Phosphatpufferlösung, pH 7.4

Zur Herstellung dieser Pufferlösung wurden 4. 404 g KH_2PO_4 und 18. 545 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ ad 1 000 ml aqua dest. gelöst.

2.133 Nilblausulfatlösung

Zur Färbung der Heinzkörper wurde Nilblausulfat als 0.5%ige Lösung in 0.9%iger Kochsalzlösung verwendet; durch hochtouriges Zentrifugieren und anschließendes Filtern durch eine Fritte wurden ungelöste Partikel entfernt.

2.2 METHODIK

2.21 Prinzipielle Versuchsanordnung (Standardversuch)

Alle Blutentnahmen von Neugeborenen und Erwachsenen wurden jeweils venös und gleichzeitig vorgenommen. Anschließend erfolgte die Angleichung der Hämoglobinkonzentration sich entsprechender Blutproben (s. 2.222). Als Ansatz wurden je 2 Teile Zitratblut und 1 Teil APH-Lösung im geschlossenen Zentrifugenröhrchen im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Zu Versuchsbeginn und dann alle 30 Minuten wurden Innenkörperpräparate hergestellt. Dabei wurden mittels Pipette 0.2 ml des Ansatzes aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und in 0.9%iger Kochsalzlösung bei 3 000 U/min

5 Minuten lang zentrifugiert. Dadurch sollte der APH-Anteil im Plasma entfernt werden, um eine eventuelle weitere Heinzkörperbildung durch extrazellulär vorhandenes APH während der 20-minütigen Färbung mit Nilblausulfat zu verhindern (s. auch 3.11). Nach Zentrifugieren wurden 0.1 ml des gewaschenen Erythrozytensedimentes mit 0.03 ml Nilblausulfatlösung auf einer vorher markierten Tüpfelplatte versetzt und hier durch Blasen mit einer Pipette gut durchmischt. Die Tüpfelplatte stand in einer feuchte Kammer (mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale). Nach einer Einwirkzeit des Farbstoffes von 20 Minuten wurden Ausstrichpräparate in der üblichen Weise angefertigt und sofort gekennzeichnet.

2.22 Einzelne Methoden

2.221 Auswertung der Nilblausulfatpräparate

Es wurde in den Nilblausulfatpräparaten der prozentuale Anteil der Heinzkörper-haltigen Erythrozyten durch Auszählen von 1000 Erythrozyten mit dem Mikroskop unter Verwendung eines Okularfensters ermittelt. Modifikationen dieses Vorgehens sind bei den Ergebnissen zur Methodik (3.12) beschrieben.

2.222 Angleichung der Hämoglobinkonzentration

Die Hämoglobinkonzentrationen der zu vergleichenden Proben von Erwachsenen- und Nabelschnurblut wurden einander vor Versuchsbeginn durch Verdünnung mit dem jeweiligen Plasma angeglichen. Die Hämoglobinbestimmungen erfolgten über Cyanmethämoglobin im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm.

2.223 Bestimmung der H.-Ionenkonzentration

Zur Ermittlung der H.-Ionenkonzentration wurde das aktuelle pH des Blut-APH-Gemisches mit dem Astrup-Radiometer der Firma

Radiometer Kopenhagen bestimmt. Die Messungen wurden während der Versuchsdauer in 1/2- bis 1-stündigem Abstand durchgeführt[+]. Die Entnahme des Blutes aus den Ansätzen erfolgte mit Hämatokritkapillaren. Parallel zur Zählung der Heinzkörper-haltigen Erythrozyten wurden pH-Messungen getrennt in Plasma und in gepackten Erythrozyten durchgeführt. Bei letzteren handelt es sich um zentrifugierte und durch dreimalige Tiefkühlung hämolysierte Erythrozyten, die somit eine Messung des Zell-pH zuließen.

2.224 Experimentelle Veränderungen der pH-Werte im Inkubationsansatz

Dazu wurden Nabelschnur- und Erwachsenenblutproben in m/15 Phosphatpufferlösungen nach SØRENSEN mit pH-Werten von 6.4, 7.4 und 8.2 dreimal gewaschen. Die Erythrozytensedimente wurden vor der Inkubation mit APH mit den entsprechenden Pufferlösungen auf drei gleiche Konzentrationen verdünnt. Die wahren Werte der Pufferlösungen lagen bei Kontrolle mit dem pH-Meter bei 6.47, 7.51 und 8.33. Entsprechend wurden 3 APH-Lösungen mit den hergestellten Pufferlösungen bereitet, damit nicht von dieser Seite eine unkorrekte Beeinflussung der pH-Entwicklung erfolgen konnte.

2.225 Verwendung verschiedener Gasgemische

Eine konstante Gasatmosphäre für die in Schütteltonometern in einem Wasserbad bei 37° C inkubierten Blut-APH-Gemische wurde durch ständiges Durchleiten von definierten Gasgemischen erhalten. Vor Versuchsbeginn wurden Blutproben und APH-Lösungen mit dem jeweiligen Gasgemisch 45 Minuten lang equilibriert. Danach erfolgte die Zugabe der APH-Lösung zu der Blutprobe mittels Spitze durch einen Durchstechkorken. Folgende Gemische kamen zur Anwendung: 100% O_2; 96% O_2 + 4% CO_2; 92% O_2 + 8% CO_2; Luft = 20% O_2; 100% Stickstoff.[+]

[+] Ich danke Herrn Prof. Dr. K. RIEGEL (München), ehem. Oberarzt an der Universitätskinderklinik Tübingen, für die Beratung bei den pH-Messungen und die Überlassung der Gasgemische.

2.226 Begriff und Abkürzungen

1. APH: Beta-Acetylphenylhydrazin (s. 2.131); die 1 g-%ige Lösung kam wegen der stets im Verhältnis 2 : 1 erfolgenden Mischung von Blut und APH in einer Endkonzentration von 15.0 mM oder selten 7.5 mM zur Anwendung.
2. Hk-Erythrozyten: Erythrozyten, die Heinzkörper enthalten.
3. Latenzzeit: Zeit vom Inkubationsbeginn bis zum Auftreten von 5% Hk-Erythrozyten.
4. 50%-Hk-Wert: Zeit vom Inkubationsbeginn bis zum Auftreten von 50% Hk-Erythrozyten.
5. 100%-Hk-Wert: Zeit vom Inkubationsbeginn bis zum Auftreten von 100% Hk-Erythrozyten.

Die unter 3 bis 5 aufgeführten Begriffe sind in Abb. 1 schematisch erläutert.

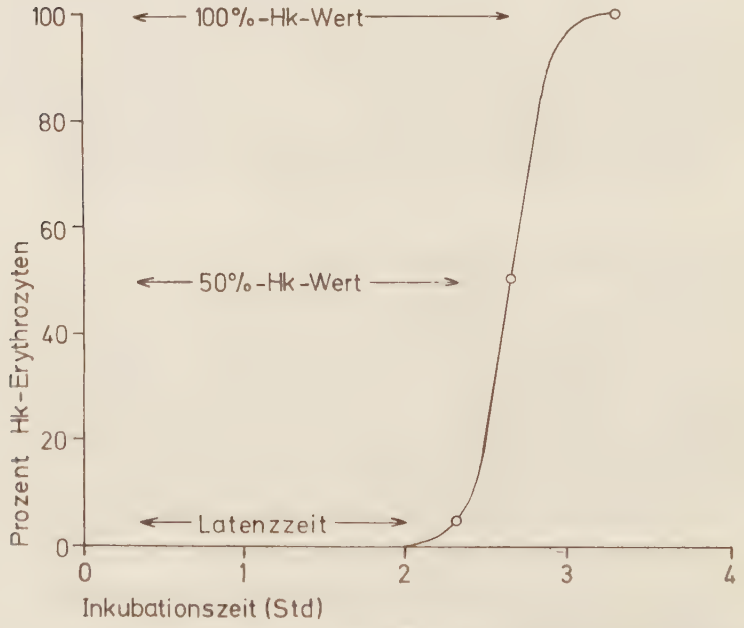

Abb. 1 Prinzipieller Ablauf der Heinzkörperbildung in Erwachsenenerythrozyten unter den Bedingungen des Standardversuches.

3. VERSUCHSERGEBNISSE

3.1 ERGEBNISSE ZUR METHODE

3.11 Heinzkörperbildung während der Inkubation mit Nilblausulfat

Zur Prüfung der Notwendigkeit der unter 2.21 beschriebenen Waschung des Blut-APH-Ansatzes in physiologischer Kochsalzlösung vor Färbung mit Nilblausulfat wurde eine Standardinkubation durchgeführt. Aus dem Blut-APH-Ansatz wurden zwei Proben entnommen, von denen eine vor der Färbung gewaschen wurde. Anschließend wurden beide Proben mit Nilblausulfat inkubiert und in 1-minütigen Abständen bis zu 10 Min. und danach in 2-minütigen Abständen bis zu 20 Min. Ausstrichpräparate angefertigt. Die Auswertung ergab, daß in beiden Anstäzen nach 5 Min. die Heinzkörper in den Erythrozyten optimal angefärbt waren. Ferner ließen sich keine quantitativen Unterschiede im Hinblick auf die Zahl der Hk-Erythrozyten erkennen.

3.12 Verfahren der quantitativen Auswertung der Heinzkörperpräparate

Bei dem in Abb. 2 dargestellten Standardversuch wurde die Zahl der Hk-Erythrozyten exakt in 2 Ansätzen des gleichen Blutes bestimmt. Die Blutentnahme zur Anfertigung der Heinzkörperpräparate erfolgte zunächst in 1/2-, im Zeitraum des zu erwartenden Kurvenanstiegs in 1/6-stündigem Abstand. Die Einzelwerte von zwei Versuchen sind in Tab. 1 wiedergegeben. Die Auszählung der Hk-Erythrozyten auf 1 000 Zellen ergab, daß die Bildung der Heinz-

körper bei 80 bis 90% der Erythrozyten während eines kleinen Zeitabschnittes von etwa einer Stunde erfolgte. Das erlaubte nach längerer Übung die Beurteilung, in welchem der in 1/2-stündigem Abstand hergestellten Präparate erstmals Hk-Erythrozyten (Latenzzeit) und in welchem gerade erstmals 100% Hk-Erythrozyten (100%-Hk-Wert) feststellbar waren.

Zwischen diesen beiden Präparaten lag dann mit großer Regelmäßigkeit eine sigmoid-förmige Kurve etwa gleicher Anstiegssteilheit.

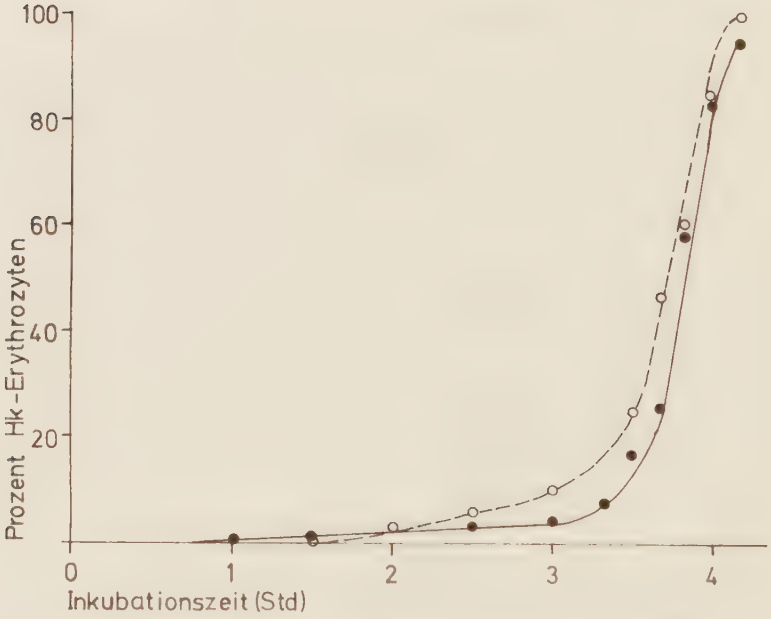

Abb. 2 Wahrer Anstieg der Hk-Erythrozytenkurve, ermittelt durch Auszählung von in 1/2- bzw. 1/6-stündigem Abstand hergestellten Präparaten. Die Einzeldaten finden sich in Tabelle 1. (●———● Versuch Nr. 1; o - - - - o Versuch Nr. 2).

3.13 Schlußfolgerung aus den Ergebnissen zur Methode

1. Die Waschung des Blut-APH-Gemisches vor Anfärbung mit Nilblausulfat ist nicht notwendig, da der noch verbleibende APH-Anteil nach den vorliegenden Ergebnissen keine weitere Heinzkörperbildung in den Erythrozyten bewirkt.
2. Der Zeitraum von der Latenzzeit bis zum 100%-Hk-Wert beträgt etwa eine Stunde, d.h. die Hk-Erythrozytenkurve weist in allen Versuchen bei den hier verwendeten APH-Konzentrationen eine übereinstimmende Steilheit auf. Deshalb ist bei einiger Erfahrung der Kurvenverlauf zwischen Latenzzeit und 100%-Hk-Wert durch Abschätzung eindeutig festlegbar. Damit erübrigt sich eine exakte Auszählung der Präparate zwischen Ende der Latenzzeit und 100%-Hk-Wert.

3.2 VERSUCHSERGEBNISSE ÜBER DIE BEDINGUNGEN DER HEINZKÖRPERBILDUNG

3.21 Verhalten der H.-Ionenkonzentrationen, Entwicklung des Zell- und Plasma-pH

In der ersten Versuchsreihe wurde das Verhalten des pH während der Inkubationszeit mit APH in je 5 Nabelschnur- und Erwachsenenblutproben untersucht. Dabei ergab sich im Laufe von drei Stunden regelmäßig ein nicht geradliniger Anstieg von pH 7.23 für Erwachsenenblut und pH 7.22 für Nabelschnurblut (Mittelwerte) auf ein pH von 7.35 bzw. 7.34. Der Verlauf war prinzipiell gleich, lediglich mit dem Unterschied, daß die Werte der Nabelschnurproben über den ganzen Versuchsablauf um etwa 0.02 pH-Einheiten niedriger waren. Die beschriebenen Beobachtungen sind aus Abb. 3 ersichtlich. Die Einzelwerte finden sich in Tab. 2. In drei weiteren Versuchen bei gleicher Versuchsanordnung wurden parallel zum Plasma-pH die pH-Werte in Erythrozyten (s. 2.223) gemessen. Dabei ergab sich, daß die Zell-pH-Werte allgemein gegenüber den

Plasma-pH-Werten um etwa 0.1 pH-Einheiten niedriger (saurer) lagen. Die pH-Werte in den Nabelschnurerythrozyten lagen jeweils wieder etwas niedriger als in den Erwachsenenerythrozyten. Die Einzelwerte dazu sind in Tab. 3 aufgeführt.

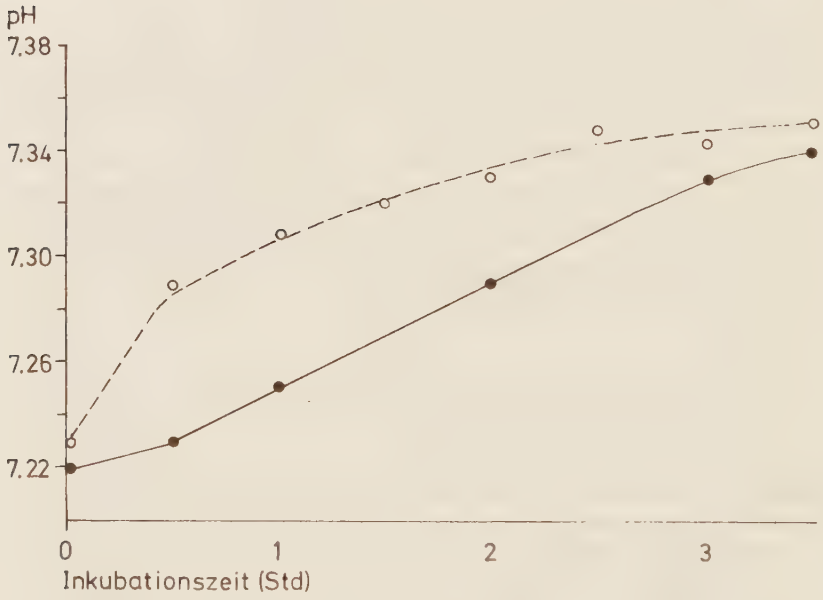

Abb. 3 Veränderungen und Differenzen der Wasserstoffionenkonzentration in Ansätzen aus Erwachsenen- (o - - - - o) und Nabelschnurblut (● ——— ●) während der Standardinkubation mit APH.

3.22 Entwicklung der H.-Ionenkonzentration bei unterschiedlichen Ausgangswerten

Fragestellung: Erfolgt die in Versuchsanordnung 3.21 beobachtete Annäherung der pH-Werte an 7.3 bis 7.4 gesetzmäßig auch dann, wenn experimentell mit extrem unterschiedlichen pH-Ausgangswerten begonnen wird?

Nach dem bei Methodik unter 2.224 angegebenen Vorgehen ergab die sofort nach Versuchsbeginn durchgeführte pH-Bestimmung der

Blut-APH-Gemische eine maximale Abweichung von 0.1 pH-Einheiten von den pH-Werten der Pufferlösungen. Die stündlichen Probeentnahmen zur pH-Bestimmung zeigten in den Proben mit hohem und niedrigem Ausgangswert eine stetige Annäherung an den Mittelwert pH 7.4, der allerdings in dem Zeitraum von 4 Stunden nicht erreicht wurde. Die primär auf pH 7.4 eingestellte Probe zeigte während der Beobachtungszeit keine Veränderung. Die pH-Werte der Nabelschnurblutproben waren gegenüber dem Erwachsenenblut wieder regelmäßig etwas zum sauren Bereich hin verschoben. Die Ergebnisse sind als Einzelwerte in Tab. 4a enthalten und graphisch in Abb. 4a dargestellt.

3.23 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der H.-Ionenkonzentration

Die exakte quantitative Beurteilung der pH-abhängigen Geschwindigkeit der Hk-Erythrozytenbildung wird bei der verwendeten APH-konzentration durch die rasche Heinzkörperbildung erschwert. Die Einzeldaten aus je drei Versuchen mit Angaben der Mittelwerte finden sich in Tab. 4b; graphisch sind die Verhältnisse in Abb. 4b dargestellt. Es läßt sich aus den Daten eindeutig ablesen, daß die Heinzkörperbildung um so langsamer erfolgt, je saurer das Milieu ist. Dabei zeigten Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten ein gleichsinniges Verhalten in Form einer pH-abhängigen Veränderung der Latenzzeit.

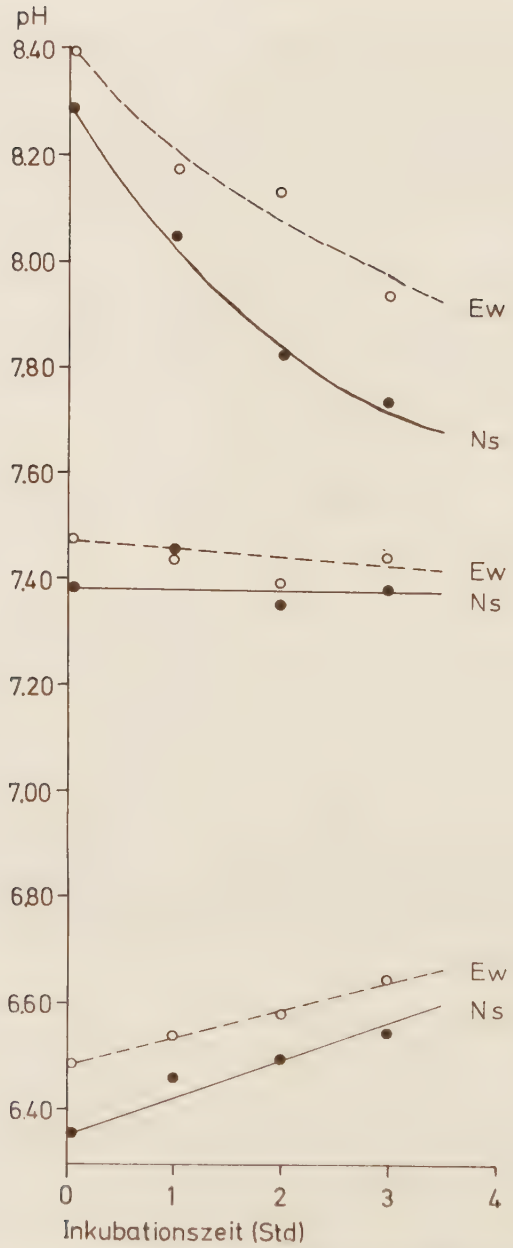

Abb. 4a Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration in Ansätzen mit verschiedenem Ausgangs-pH während der Standardinkubation. Erwachsenenblut = Ew (o- - - - o), Nabelschnurblut = Ns (●——●).

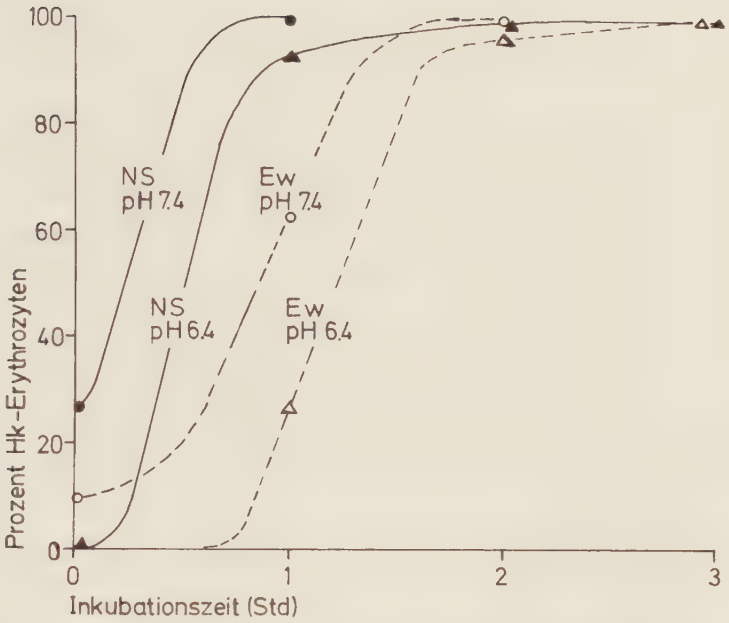

Abb. 4b Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung vom Ausgangs-pH. Die bei pH 8.2 noch etwas rascher als bei pH 7.4 erfolgende Heinzkörperbildung wurde wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Erwachsenenblut = Ew (offene Symbole), Nabelschnurblut = Ns (gefüllte Symbole).

3.24 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Sauerstoffkonzentration

Die experimentellen Voraussetzungen für die Inkubation von Blut und APH in einer definierten Gasatmosphäre mit verschieden hohen Sauerstoffkonzentrationen von 100% bis 0% sind oben (2.225) dargestellt. Die quantitative Auswertung dieser Versuche ergab folgende Resultate, die aus den Mittelwerten in Tab. 5 abgelesen werden können, welche der Abb. 5 zugrunde liegen:

1. Bei Abwesenheit von Sauerstoff erfolgt sowohl in Erwachsenen- als auch in Neugeborenenerythrozyten keine Heinzkörperbildung während des Versuchszeitraumes von 4 1/2 Stunden.
2. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 20% (Luft) ist der 50%-Hk-Wert in den Erwachsenenerythrozyten um 1 1/2 Stunden gegenüber dem der Neugeborenenerythrozyten verzögert.
3. Bei sehr hohen Sauerstoffanteilen im Gasgemisch ist bei der hier gegebenen APH-Konzentration von 15 mM kein wesentlicher Unterschied mehr zwischen beiden Blutproben meßbar.
4. Die Zunahme in der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung erfolgt stets über eine Verkürzung der Latenzzeit. Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten verhalten sich dabei unter den verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen prinzipiell gleich.

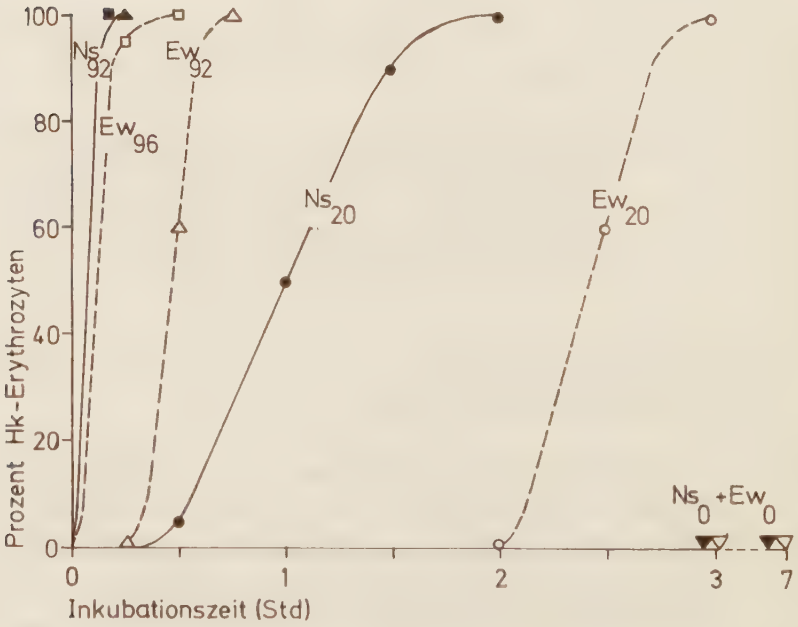

Abb. 5 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung von der Sauerstoffspannung (0 - 96%). Erwachsenenblut = Ew (offene Symbole), Nabelschnurblut = Ns (gefüllte Symbole). Dabei ist die Sauerstoffionenkonzentration in Prozent als Index eingezeichnet.

3.25 Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Inkubationsdauer und der APH-Konzentration

Bei unveränderter Standardversuchsanordnung (s. 2.21) wurde den Erythrozyten APH-Lösung in Endkonzentrationen von 3.75 mM, 7.5 mM und 15 mM zugesetzt. Tab. 6 enthält die Einzelwerte und Abb. 6 dokumentiert die Ergebnisse:

1. Es besteht eine direkte Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Versuchsdauer.
2. Die Heinzkörperbildung erfolgt mit zunehmend höheren APH-Konzentrationen entsprechend schneller.
3. Der prinzipielle Kurvenverlauf ist stets identisch. Differenzen sind, auch beim Vergleich von Nabelschnur- und Erwachsenenblut, durch die unterschiedlich lange Latenzzeit gegeben.

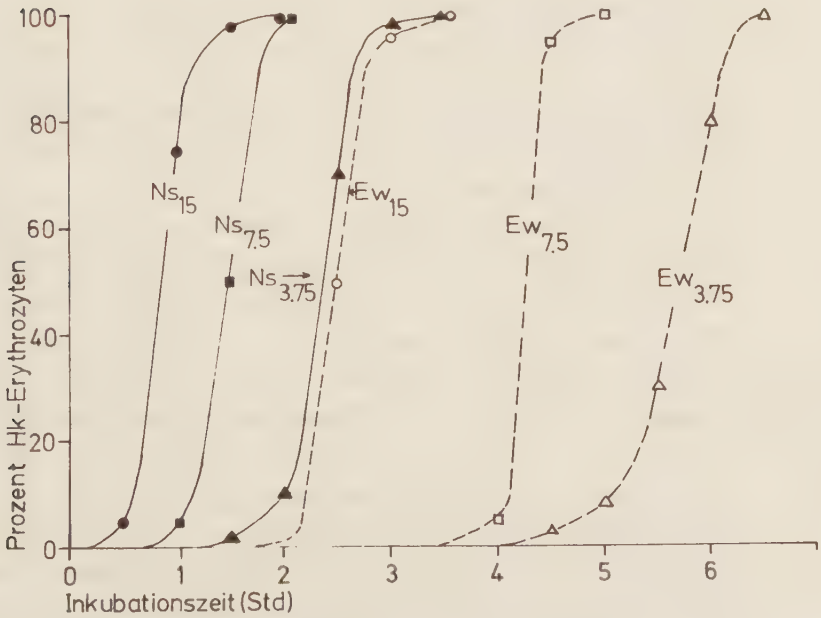

Abb. 6 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung von der APH-Konzentration in Erwachsenen- (Ew = offene Symbole) und Nabelschnurerythrozyten (Ns = geschlossene Symbole). Die APH-Konzentration in mM als Index eingezeichnet.

3.26 Einfluß von EDTA-Zusatz auf die Heinzkörperbildung

Eine 0.3 molare EDTA-Lösung in m/15 Phosphatpuffer, pH 7.4, wurde im Verhältnis 3:1 mit 1 g-%iger APH-Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde im Verhältnis 2:1 mit Erwachsenen- und Nabelschnurblut standardinkubiert, so daß in der Endkonzentration eine 0.15 molare EDTA-Lösung und eine 0.0075 molare APH-lösung vorlagen.
Der 50%-Hk-Wert war bei der Erwachsenenblutprobe nach 6 Stunden, bei der Nabelschnurblutprobe nach 4 Stunden erreicht, d.h. die Heinzkörperbildung trat in beiden Proben gegenüber der Norm erheblich verzögert auf.

3.3 HEINZKÖRPERBILDUNG IN ERYTHROZYTEN VON NEUGEBORENEN VOR UND NACH AUSTAUSCHTRANSFUSION

Fragestellung: Ändern sich die Eigenschaften von Erwachsenenerythrozyten nach einer Austauschtransfusion bezüglich der Heinzkörperempfindlichkeit?
In dieser Versuchsserie wurden die Blutproben von 7 Kindern mit Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) infolge Rh- bzw. AO-Inkompatibilität nach dem unter 2.12 beschriebenen Vorgehen untersucht (hämatologische Daten der Kinder s. Tab. 7a). In vier Fällen konnte die Heinzkörperbildung nach einer zweiten Austauschtransfusion geprüft werden. Die Ergebnisse der Einzelversuche (s. Tab. 7b) stimmen prinzipiell überein. Es ließen sich folgende Veränderungen im Ablauf der Heinzkörperbildung nachweisen:
Erythrozyten von Neugeborenen mit MHN vor Austauschtransfusion zeigen keine Unterschiede in der Heinzkörperempfindlichkeit gegenüber Erythrozyten von gesunden Neugeborenen. Entsprechend stimmen auch die Werte aus Spenderkonservenblut mit denen anderer Erwachsenenblutkontrollen überein. Nach der Austauschtransfusion ändert sich die Heinzkörperempfindlichkeit in transfundierten

Erwachsenenerythrozyten derart, daß sie sich der von Neugeborenen angleicht. Dieses Verhalten ist bereits direkt im Anschluß an die Austauschtransfusion und dann unverändert während der folgenden Tage (s. Abb. 7) nachzuweisen. In vier Fällen wurden Kontrolluntersuchungen über den 10. Tag hinaus, in einem Fall bis zum 29. Tag p.t. durchgeführt. Dabei war in keinem Fall eine rückläufige Entwicklung im Sinne einer Angleichung an die Erwachsenenwerte nachweisbar. Dieselben Beobachtungen gelten auch für die 4 Kinder, bei denen wiederholt Austauschtransfusionen durchgeführt werden mußten.

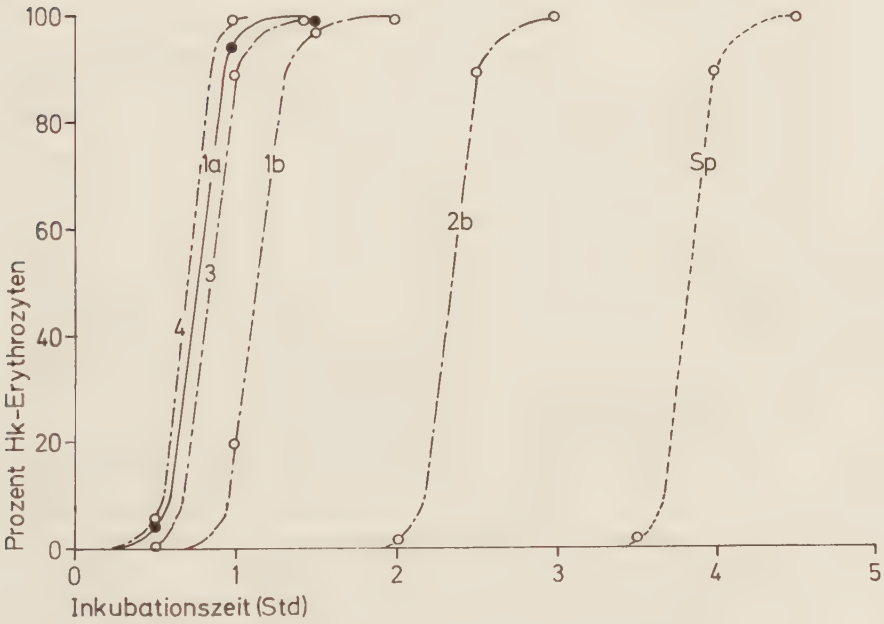

Abb. 7 Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten vor der ersten Austauschtransfusion (1a). Veränderung der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung im ursprünglichen Spenderblut (Sp) nach erster (1b) und zweiter (2b) Austauschtransfusion, sowie nach 8 (3) und 11 (4) Tagen. Dazu Einzelwerte unter Versuch Nr. 2 in Tabelle 7b.

3.4 TABELLEN

nach .. Stunden in Versuch-Nr.	Prozent Erythrozyten mit Heinzkörpern 1	2
0	-	-
1	0.8	-
1 1/2	1.6	0.4
2		3.2
2 1/2	3.2	6.6
3	4.6	10.4
3 2/6	8.2	
3 1/2	17.6	25.0
3 4/6	26.0	47.0
3 5/6	58.6	60.0
4	83.8	83.0
4 1/6	94.6	100.0

Tab. 1 Werte der Abb. 2

Versuch -Nr.		pH-Werte nach Stunden 0	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2
(Ew)	1	7.20	7.25	7.28		7.35		7.35	7.38
	2	7.27	7.35	7.33	7.34	7.36	7.35	7.35	7.35
	3	7.25	7.29	7.32	7.34	7.31	7.35	7.32	7.31
	4	7.20	7.26	7.35	7.35				
	5	7.24	7.29	7.29	7.23	7.31	7.34	7.35	7.36
	M	7.23	7.29	7.31	7.32	7.33	7.35	7.34	7.35
(Ns)	1	7.22	7.20	7.20		7.26		7.29	7.34
	2	7.24	7.26	7.28	7.32	7.33	7.33	7.34	7.45
	3	7.22	7.27	7.27	7.32	7.27	7.35	7.34	7.34
	4	7.18	7.17	7.27	7.31				
	5	7.25	7.24	7.25	7.33	7.29	7.34	7.34	7.34
	M	7.22	7.23	7.25	7.32	7.29	7.34	7,33	7,34

Tab. 2 Werte der Abb. 3, pH-Einzel- und Mittelwerte (M) aus 5 Nabelschnur-(Ns) und 5 Erwachsenenblutproben (Ew) während einer Standardinkubation.

		Versuch -Nr.	pH-Werte nach Stunden 0	1	2	3	4
I. Zell-pH	(Ew)	1	7.18	7.09	7.16	7.13	7.19
		2	7.12	7.14	7.12	7.12	7.18
		3	7.02	6.88	7.10	7.20	7.16
		M	7.11	7.04	7.12	7.15	7.18
	(Ns)	1	7.19	7.11		7.14	7.13
		2	7.04	7.01	7.03	7.04	7.09
		3	7.13	6.96	7.10	7.11	7.18
		M	7.12	7.03	7.07	7.09	7.13
II. Plasma-pH	(Ew)	1	7.21	7.32	7.40	7.44	7.55
		2		7.26	7.28	7.26	7.32
		3	7.09	7.22	7.10	7.36	7.42
		M	7.15	7.27	7.26	7.35	7.43
	(Ns)	1	7.22	7.19	7.22	7.38	7.33
		2		7.13	7.11	7.12	7.11
		3	7.13	7.16	7.11	7.32	7.34
		M	7.18	7.16	7.15	7.27	7.26

Tab. 3 Veränderungen und Differenzen der H.-Ionenkonzentration mit Angabe der Mittelwerte in Ansätzen aus Erwachsenen- (Ew) und Nabelschnurblut (Ns) bei getrennter Messung von Zell- und Plasma-pH während einer Standardinkubation.

Blut von	Ausgangs-pH-Wert	pH-Werte nach Stunden 0	1	2	3	4
I. Erwachsenen	8.33	8.40	8.17	8.14	7.93	7.94
	7.51	7.48	7.44	7.38	7.45	7.32
	6.47	6.48	6.54	6.58	6.65	6.40
II.Neugeborenen	8.33	8.30	8.05	7.82	7.74	7.66
	7.51	7.39	7.46	7.35	7.38	7.30
	6.47	6.36	6.47	6.50	6.54	6.32

Tab. 4a Werte der Abb. 4a, Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration bei verschiedenem Ausgangs-pH.

Blut von	pH-Wert	Versuch -Nr.	% Hk-Erythroz. nach Stunden 0	1	2	3	4
I. Erwachsenen	6.4	1	0	80	90	95	100
		2	0	0	100	100	100
		3	0	0	100	100	100
		M	0	27	97	98	100
	7.4	1	30	100	100		
		2	0	90	100		
		3	0	0	100		
		M	10	63	100		
	8.2	1	100	100	100		
		2	0	100	100		
		3	5	95	100		
		M	35	98	100		
II. Neugeborenen	6.4	1	0	90	98	100	
		2	0	100	100	100	
		3	0	90	100	100	
		M	0	93	98	100	
	7.4	1	80	100			
		2	0	100			
		3	0	100			
		M	27	100			
	8.2	1	100	100			
		2	0	100			
		3	10	100			
		M	37	100			

Tab. 4b Einzel- und Mittelwerte (M) der Abb. 4b, Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Blut von	O_2-Sp.	Prozent Hk-Erythrozyten nach Stunden										
		0	1/4	1/2	3/4	1	6/4	2	10/4	3	..	7
I. Ew	100	0	100									
	96	0	95	100								
	92	0	0	60	100							
	20	0	0	0	0	0	0	0	60	100		
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
II. Ns	100	0	100									
	96	0	100									
	92	0	100									
	20	0	0	5		50	90	100				
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0

Tab. 5 Werte der Abb. 5, Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung in Erwachsenen- (Ew) und Nabelschnurblut (Ns) von der Sauerstoffspannung (O_2-Sp.).

Blut von	APH	Versuch -Nr.	Prozent Hk-Erythrozyten nach Stunden 0	1/2	1	3/2	2	5/2	3	7/2	4	9/2	5	11/2	6	13/2
Erwachsenen	15	1	0	0	0	0	0	50	90	100						
		2	0	0	0	0	0	50	100	100						
		M	0	0	0	0	0	50	98	100						
	7.5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	95	100			
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	95	100			
		M	0	0	0	0	0	0	0	0	5	95	100			
	3.75	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	30	60	100
		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	30	100	100
		M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8	30	80	100
Neugeborene	15	1	0	5	100	100	100									
		2	0	5	50	95	100									
		M	0	5	75	98	100									
	7.5	1	0	0	5	50	100									
		2	0	0	5	50	100									
		M	0	0	5	50	100									
	3.75	1	0	0	0	5	10	50	95	100						
		2	0	0	0	0	10	90	100	100						
		M	0	0	0	3	10	70	98	100						

Tab. 6 Einzel- und Mittelwerte (M) der Abb. 6, Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Heinzkörperbildung von der APH-Konzentration in mM (APH).

Versuch-Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Name	Claudia W.	Rolf S.	Ronald K.	Hans D.	Martin L.	Dorot. W.	Ellen K.
Geb. Datum	1.4.66	3.4.66	5.4.66	14.4.66	21.3.66	24.3.66	30.3.66
Geb. Gewicht (g)	2900	3470	2720	3900		2290	3900
Diagnose Inkompatibilität	Rh-	Rh-	Rh-	Rh-	AO-	AO-	Rh-
Bilirubin i.S. (mg%) vor 1. AT	22.0	18.7	8.7	13.1	21.6	12.1	9.8
nach 1. AT	8.9	8.7	4.9		7.3		3.8
Retikulozyten (‰) vor 1. AT	77	117		132	40	15	
1. AT am Lebenstag	7.	3.	1.	1.	4.	1.	1.

Tab. 7a Klinische Daten der Kinder, deren Blut vor und nach Austauschtransfusion auf Heinzkörperempfindlichkeit geprüft wurde.

Versuch -Nr.	Tage nach erster Austauschtransfusion 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13 .. 17 .. 20 .. 29
1	I.n. 9(18)					3(14)							
2	I.v. 3(15) I.n. 5(15)		II.v. 5(19) II.n. 9(14)					3(14)			3(15)		
3	I.v. 9(18)	II.	7(13)		III.			3(14)			7(13)		5(13)
4	I.v. 5(17) I.n. 8(14)	5(15)	II.					5(13)					
5	I.n. 3(13)		II.			6(11)		7(16)				8(16)	
6	I.v. 5(15)				8(11)		10(12)						7(16) 9(14) 6(14)
7	I.v. 6(11)						7(16)		7(13)				

Tab. 7b Zusammenstellung der bei allen Austauschtransfusionen erhaltenen 50 %-Hk-Werte. Mit römischen Ziffern (I., II. und III.) sind die bei jedem Kind durchgeführten Austauschtransfusionen gekennzeichnet. Dabei ist angegeben, ob das für die Inkubation verwendete Blut vor (v.) und /oder nach (n.) der Austauschtransfusion vom Kind und gleichzeitig von der Spenderblutkonserve entnommen wurde. In arabischen Ziffern sind die Zeiten (in Klammern Kontrollwerte) notiert, nach denen der 50 %-Hk-Wert erreicht war. Dabei wurde nur der Zähler der in 1/4 Stunden umgerechneten Zeit angegeben.

4. DISKUSSION

Die Erythrozyten Neugeborener unterscheiden sich durch zahlreiche strukturelle und funktionelle Besonderheiten von denen Erwachsener (Übersicht bei KLEIHAUER 1966), die das Hämoglobin, die fermentchemische Ausstattung und die Strukturen der Erythrozytenmembran betreffen. Bei den Differenzen zu Erwachsenenerythrozyten handelt es sich jedoch nicht um Minderleistungen der fetalen Erythrozyten, sondern um physiologische Gegebenheiten, die sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im Laufe der Entwicklung den Erwachsenenwerten angleichen. Der von KLEIHAUER et al. (1957) erbrachte Nachweis, daß in der gleichen roten Blutzelle nebeneinander fetales- und Erwachsenen-Hämoglobin vorhanden ist, zeigt deutlich, daß die Ablösung der roten Blutzelle gleitend erfolgt und nicht im Rahmen eines einfachen Generationswechsels. Darum werden auch aus dem Vergleich zur "Erwachsenennorm" abgeleitete Bezeichnungen wie "funktionelle Insuffizienz" oder "Unreife" nicht den tatsächlichen Gegebenheiten unter physiologischen Verhältnissen gerecht.

Dagegen besteht, wie eingangs erwähnt, unter pathologischen Bedingungen eine erhöhte Neigung der Neugeborenen, an toxischen Methämoglobinämien und Innenkörperanämien zu erkranken. Der häufigen spontanen Innenkörperbildung liegen, soweit erkennbar, keine pathologischen Bedingungen zugrunde, und ihr kommt normalerweise auch kein Krankheitswert zu (GASSER u. WILLI 1952; WILLI u. HARTMEIER 1950).

Für das Phänomen der besonderen Heinzkörperempfindlichkeit von Neugeborenenerythrozyten unter Einwirkung toxischer Substanzen hat sich bis heute keine hinreichende Erklärung gefunden. Andererseits ist es bemerkenswert, daß die Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten bisher nicht so systematisch untersucht worden ist, wie das von WALLER u. LÖHR (1963) an Erwachsenenerythrozyten durchgeführt wurde.

Aus den Ergebnissen der vorangestellten systematischen Untersuchungen zur Heinzkörperbildung geht hervor, daß der wesentliche Unterschied im Ablauf der Heinzkörperbildung in Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten in der Länge der Latenzzeit liegt, die vom Inkubationsbeginn bis zum Auftreten der ersten Heinzkörper reicht. Daran anschließend finden sich, bedingt durch die unterschiedliche Latenzzeit, parallel verschobene Kurven gleicher Steilheit (Abb. 6). Die Veränderung einzelner Bedingungen abweichend vom Standardversuch (s. Versuch 2.21) hat jeweils nur gleichsinnige Veränderungen der Latenzzeit zur Folge. Das trifft für die Veränderung der pH-Werte, der Sauerstoffkonzentration (s. auch BORGES u. DESFORGES 1967) der Inkubationsdauer und der APH-Konzentration zu (s. Versuche 3.23 bis 3.25). Ebenso ist in Anwesenheit von Äthylendiamintetraacetat (EDTA) eine gleichsinnige Verzögerung der Latenzzeit in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten nachweisbar. Diese Befunde stimmen mit den von WALLER u. LÖHR (1963) erhobenen überein, soweit sie die Erwachsenenerythrozyten betreffen. Den Differenzen in der Wasserstoffionenkonzentration in den Ansätzen von Nabelschnur- und Erwachsenenerythrozyten dürfte keine Bedeutung bei der vorliegenden Fragestellung zukommen. Da bei einer pH-Erniedrigung gerade eine verminderte Heinzkörperbildung nachzuweisen ist (Abb. 4b), müßte aus den in den Ansätzen mit Nabelschnurblut konstant niedrigeren pH-Werten eher der Effekt einer verzögerten Heinzkörperbildung zu erwarten sein. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die erhöhte Heinzkörperempfindlichkeit der Neugeborenenerythrozyten bei allen vorgenommenen Variationen der Versuchsbedingungen stets nachweisbar ist. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Erscheinung müssen sich darum vorrangig auf die Latenzzeit konzentrieren.

Die bisher durchgeführten experimentellen Untersuchungen zur Frage der gesteigerten Heinzkörperempfindlichkeit müssen in der Diskussion alle Bestandteile des Erythrozyten einbeziehen, vor allem die Enzyme, das fetale Hämoglobin und die Erythrozytenmembran.

Wie bei dem Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Mangel wurde auch in den Erythrozyten Neugeborener unter Inkubation mit Acetylphenylhydrazin in

vitro eine Instabilität des reduzierten Glutathions gefunden (GROSS et al. 1958; ZINKHAM 1959). Dabei war jedoch kein Mangel an Glucose-6-Phosphatdehydrogenase nachweisbar, vielmehr wurde sogar eine gegenüber der Erwachsenennorm gesteigerte Aktivität bei Neugeborenen beschrieben (STAVE u. POHL 1959; LÖHR u. WALLER 1962). Die Glutathioninstabilität bei Neugeborenen ist im Gegensatz zur verstärkten Heinzkörperbildung durch Zusatz von Glucose zu den Blut-APH-Ansätzen aufhebbar und kann darum nicht ursächlich für die besondere Heinzkörperempfindlichkeit der Neugeborenenerythrozyten verantwortlich sein (ZINKHAM 1959; TJOA 1960).

Auch wurde eine Beziehung zwischen der bei Neugeborenen gegenüber Erwachsenen erniedrigten Katalase und der verstärkten Heinzkörperbildung vermutet (JONES u. McCANCE 1949; BRENNER u. ALLISON 1953; KÜNZER 1956; GROSS, BRACCI et al. 1967). Diese Vorstellung wurde durch den in vitro Nachweis einer nicht gesteigerten Heinzkörperbildung bei Patienten mit Akatalasie bzw. Hypokatalasie unter Wirkung von Acetylphenylhydrazin widerlegt (MARTI 1963).

In jüngeren Untersuchungen wurde auf die Bedeutung der Glutathionperoxydase (GSH-P) für die besondere Heinzkörperempfindlichkeit der Neugeborenenerythrozyten hingewiesen (GROSS, BRACCI et al. 1967; NECHELES, MALDONADO et al. 1969; BRACCI, CORVAGLIA et al 1969). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion zwischen intermediär entstandenem Peroxyd und reduziertem Glutathion (GSH) unter Bildung von oxydiertem Glutathion (GSSG), Wasser und Sauerstoff (COHEN u. HOCHSTEIN 1963; JACOB, INGBAR u. JANDL 1965). Bei vergleichenden Untersuchungen der Heinzkörperbildung unter Wirkung von Wasserstoffperoxyd und parallel vorgenommenen Messungen der GSH-Peroxydase Aktivität wurde diese signifikant erniedrigt gefunden in Erythrozyten von Neugeborenen gegenüber Erwachsenen (GROSS, BRACCI et al. 1967; NECHELES, BOLES u. ALLEN 1968; BRACCI, CORVAGLIA et al. 1969). Die dabei auf die gleiche Hämoglobinkonzentration bezogene GSH-Peroxydase Aktivität weist jedoch bei Neugeborenen eine erhebliche Schwankungsbreite auf, die sich etwa zur Hälfte mit dem Feld der Erwachsenenwerte überschneidet (GROSS,

BRACCI et al. 1967). Vergleicht man jedoch die auf das Zellvolumen bezogene Aktivität, d.h. die GSH-Peroxydase Aktivität pro Einzelzelle, so liegen die Werte für Neugeborene kaum unter der Erwachsenennorm. Dasselbe wurde übrigens auch für die Katalase Aktivität nachgewiesen (GRÖSCHNER 1960). In Erythrozyten von Neugeborenen mit genetisch bedingtem GSH-Peroxydase Mangel ließ sich unter in vitro Inkubation mit APH eine im Vergleich zu gesunden Neugeborenen deutlich verstärkte Heinzkörperbildung nachweisen (NECHELES, BOLES u. ALLEN 1968). Entsprechend fand sich aber auch in den Erythrozyten eines Erwachsenen mit homozygotem GSH-Peroxydase Mangel während einer akuten hämolytischen Krise eine erhebliche Innenkörperanämie (NECHELES, MALDONADO et al. 1969). Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von BRACCI et al. (1969), daß auch bei gleicher GSH-Peroxydase Aktivität die Neugeborenenerythrozyten eine wesentlich größere Heinzkörperempfindlichkeit aufweisen als Erwachsenenerythrozyten. Die vergleichende Gegenüberstellung dieser Untersuchungsergebnisse erlaubt die Folgerung, daß die GSH-Peroxydase nicht allein für die erhöhte Heinzkörperempfindlichkeit verantwortlich sein kann. Ebensowenig ließ sich eine Abhängigkeit der vermehrten Heinzkörperempfindlichkeit der Neugeborenenerythrozyten vom fetalen Hämoglobin nachweisen. Die zu dieser Frage unternommenen Untersuchungen von ULUKUTLU et al. (1966) ergaben, daß in Erythrozyten mit adultem Hämoglobin (HbA-Zellen) aus dem Blut Neugeborener wesentlich schneller Heinzkörper gebildet werden, als in HbA-Zellen aus Erwachsenenblut. Dagegen war die Heinzkörperempfindlichkeit von HbA-Zellen Neugeborener im Vergleich zu HbF-Zellen des gleichen Blutes deutlich geringer, während HbF- und Intermediärzellen sich praktisch gleich verhielten. Die von KLEIHAUER et al. (1968) unter gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen an Erythrozyten von einem Patienten mit homozygoter β-Thalassämie, der einen gleich hohen Anteil von HbF-Zellen wie Neugeborene aufwies, ließen keine Unterschiede bezüglich der Heinzkörperempfindlichkeit gegenüber normalen Erwachsenenerythrozyten erkennen. Untersuchungen an Patienten mit Cooley-Anämie müssen noch auf eine breitere Basis gestellt werden, bevor relevante Aussagen und Analogieschlüsse gemacht werden können.

Bezüglich des abweichenden Verhaltens der Neugeborenenerythrozyten im Hinblick auf den HbF-Gehalt der Zellen ordnen sich diesen Ergebnissen die vorliegenden Daten über die Heinzkörperbildung in Erythrozyten Neugeborener vor und nach Austauschtransfusion zu. Damit findet auch die schon erwähnte klinische Beobachtung einer nach Austauschtransfusion bei einem Neugeborenen aufgetretenen toxischen Innenkörperanämie (IRLE 1964) ihre experimentelle Bestätigung.

Wie kann nun das Phänomen der "erworbenen hohen Heinzkörperempfindlichkeit" von Erwachsenenerythrozyten im Kreislauf Neugeborener erklärt werden. Eine entscheidende Beeinflussung der Erwachsenenerythrozyten durch noch vorhandene fetale Erythrozyten kann auch ausgeschlossen werden, da nach zweimaliger Austauschtransfusion ihr Anteil auf etwa 5% vom Ausgangswert absinkt.

Man könnte daher eine Änderung gerade der Eigenschaften der transfundierten Erwachsenenerythrozyten im Neugeborenenorganismus annehmen, die im Neugeborenenerythrozyten für dessen gesteigerte Heinzkörperempfindlichkeit verantwortlich sind. Daran können theoretisch alle Zellanteile, Hämoglobin, Enzyme oder Membran, beteiligt sein. Ein Wechsel des genetisch determinierten Hämoglobinmusters der Erythrozyten ist unmöglich. Denkbare Änderungen der Enzymaktivitäten konnten, wie dargelegt, als ursächlich nicht eindeutig belegt werden.

Als eine mögliche Erklärung und vorläufige Arbeitshypothese bleiben sekundär auftretende Veränderungen des Phospholipidgehaltes in der Membran der transfundierten Erythrozyten. Orientierende Untersuchungen an experimentell veränderten Erythrozytenmembranen ergaben eindeutige Hinweise, daß die Heinzkörperempfindlichkeit von Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten erheblich variiert werden kann (KLEIHAUER u. KOHNE 1970). Weiterhin ist bekannt, daß ein dynamischer, partieller Austausch zwischen Plasma- und Membranlipiden erfolgt (MULDER u. DEENEN 1965; COOPER u. JANDL 1968; REED 1968).

Andererseits erfolgt wahrscheinlich keine de novo Synthese von Phospholipiden in der Zellmembran (MARKS et al. 1960; VAN DEENEN u. DE GIER 1964), so daß eine durch äußeres Milieu veränderte Komposition

nicht durch Neubildung kompensiert werden kann. Schließlich wurden übereinstimmend signifikante Unterschiede im Phospholipidgehalt von Plasma und Erythrozyten der Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen beschrieben. Bezüglich der anderen Lipide sind die Angaben teilweise divergent (BENTLEY 1962; CROWLEY et al. 1965; HOLLAN u. BREUER 1968; NEERHOUT 1968; HÜRTER et al. 1970). Um die hier aufgestellte Arbeitshypothese zu beweisen, sind zunächst Untersuchungen über Plasma- und Erythrozytenlipide vor und nach Austauschtransfusion erforderlich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichend an Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten die grundsätzlichen Bedingungen der Heinzkörperbildung in vitro untersucht. Auf Grund der dabei gewonnenen Erfahrungen konnte anschließend in einer Standardversuchsanordnung die Frage geprüft werden, ob Spendererythrozyten von Erwachsenen nach einer Austauschtransfusion die Eigenschaft der erhöhten Heinzkörperempfindlichkeit von Neugeborenenerythrozyten übernehmen. Aus den Ergebnissen wurden folgende Schlüsse gezogen:

1. Der Ablauf der Heinzkörperbildung erfolgt in Neugeborenen- und Erwachsenenerythrozyten prinzipiell gleich, wobei unter verschiedenen experimentellen Bedingungen die erhöhte Heinzkörperempfindlichkeit der Neugeborenenerythrozyten stets nachweisbar bleibt.
2. Die Differenzen in der Heinzkörperbildung sind allein durch Unterschiede in der Latenzzeit gegeben; im weiteren Ablauf finden sich identische, jedoch zeitlich verschobene Kurven mit gleicher Anstiegssteilheit.
3. Die Länge der Latenzzeit bei der Heinzkörperbildung ist abhängig von der Inkubationsdauer, der APH-, H.-Ionen- und Sauerstoffkonzentration.
4. Nach Austauschtransfusion übernehmen Erwachsenenerythrozyten im Neugeborenenkreislauf die Eigenschaft der vermehrten Heinzkörperempfindlichkeit in einem Ausmaß, wie es für Neugeborenenerythrozyten charakteristisch ist.

Bei der in diesem Zusammenhang geführten Diskussion zur Frage der gesteigerten Heinzkörperempfindlichkeit von Neugeborenenerythrozyten wurden die bisher für dieses Phänomen verantwortlich gemachten Fakten als unbefriedigend befunden. Es wurde auf die mögliche Bedeutung der Erythrozytenmembran hingewiesen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, D.W. and J.H. JANDL: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. J. clin. Invest. 40, 454 (1961)

2. BACHMANN, F. and H.R. MARTI: Hemoglobin Zürich. II. Physico-chemical properties of the abnormal hemoglobin. Blood 20, 272 (1962)

3. BENTLEY, H.P. jr.: Erythrocyte phospholipids in the newborn infant. Proc. Soc. exper. Biol. 111, 591 (1962)

4. BETKE, K.: Erworbene hämolytische Erkrankungen des Neugeborenen. In Hämolyse u. hämolytische Erkrankungen, p. 245 (Schubothe, Edit.). Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1961

5. BETKE, K. und H. SCHALL: Akute hämolytische Innenkörperanämie mit Methämoglobinämie und Methämalbuminämie bei einem Neugeborenen, wahrscheinlich bedingt durch Naphthalin. Z. Kinderheilk., 81, 379 (1958)

6. BEUTLER, E.: Drug-induced haemolytic anaemias and the mechanism and significance of Heinz body formation in red blood cells. Nature 196, 1095 (1962)

7. BEUTLER, E., R. DERN and A. ALVING: The hemolytic effect of primaquine. VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine. J. Lab. clin. Med. 45, 40 (1955)

8. BEUTLER, E. and M.C. BALUDA: The role of methemoglobin in oxidative degradation of hemoglobin. Acta haemat. 27, 321 (1962)

9. BORGES, A. and J.F. DESFORGES: Studies of Heinz body formation. Acta haemat. 37, 1 (1967)

10. BRACCI, R., E. CORVAGLIA, P. PRINCI, F. BETTINI and C. PINDINELLI: The role of GSH-peroxydase deficiency in the increased susceptibility to Heinz body formation in the erythrocytes of newborn infants. Ital. J. Biochem. 18, 100 (1969)

11. BRENNER, S. and A.C. ALLISON: Catalase inhibition: a possible mechanism for the production of Heinz Bodies in erythrocytes.
Experientia 9, 381 (1953)

12. BROWN, A.K. and S.L. BUQUIR: Spontaneous Heinz body formation in full-term and premature infants.
Am. J. Dis. Child. 102, 589 (1961)

13. COHEN, G. and P. HOCHSTEIN: Glutathione peroxydase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes.
Biochemistry 2, 1420 (1963)

14. COOPER, R.A. and J.H. JANDL: Physiologic and pathologic alterations of red cell lipids, membrane area, and shape. p. 376. In Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten (E. Deutsch, E. Gerlach, K. Moser, Edits.)
Thieme Verlag, Stuttgart 1968

15. CROWLEY, J., P. WAYS and J.W. JONES: Human fetal erythrocyte and plasma lipids.
J. clin. Invest. 44, 989 (1965)

16. DAWSON, J.P., W.W. THAYER an J.F. DESFORGES: Acute hemolytic anemia in the newborn infant due to naphthalene poisoning: Report of two cases, with investigations into the mechanism of the disease.
Blood 13, 1113 (1958)

17. van DEENEN, L.L.M. and J. de GIER: Chemical composition and metabolism of lipids in red cells of various animal species. In: The Red Blood Cell, p. 243 (C. Bishop, and D.M. Surgenor, Edits.)
Academic Press, New York and London 1964

18. GASSER, C.: Die hämolytische Frühgeburtenanämie mit spontaner Innenkörperbildung: ein neues Syndrom, beobachtet an 14 Fällen.
Helv. paediat. Acta 8, 491 (1953)

19. GASSER, C.: Perakute hämolytische Innenkörperanämie mit Methämoglobinämie nach Behandlung eines Säuglingsekzems mit Resorcin.
Helv. paediat. Acta 9, 285 (1954)

20. GASSER, C. und J. KARRER: Deletäre hämolytische Anämie mit "Spontan-Innenkörper"-Bildung bei Frühgeburt.
Helv. paediat. Acta 27, 387 (1948)

21. GASSER, C. und H. WILLI: Spontane Innenkörperbildung bei Milzagenesie.
Helv. paediat. Acta 7, 369 (1952)

22. GOLDSTEIN, G.W., L. HAMMAKER and R. SCHMID: The catabolism of Heinz bodies. An experimental model demonstrating conversion to non-bilirubin catabolites.
Blood 31, 388 (1968)

23. GRÖSCHNER, E.: Erythrozytenkatalase bei Frühgeborenen und reifen Säuglingen in der Neugeborenenperiode.
Med. Dissertation, Freiburg 1960

24. GROSS, R.T., R.E. HURWITZ and P.A. MARKS: An hereditary enzymatic defect in erythrocyte metabolism: Clucose-6-phosphate dehydrogenase defiency.
J. clin. Invest. 37, 1176 (1958)

25. GROSS, R.T., R. BRACCI, N. RUDOLPH, E.A.R. SCHROEDER and J.A. KOCHEN: Hydrogen peroxide toxicity and detoxification in the erythrocytes of newborn infants.
Blood 29, 481 (1967)

26. HANSSLER, H.: Lebensbedrohliche Naphthalinvergiftung bei einem Säugling durch Vaporindämpfe.
Dtsch. med. Wschr. 89, 1794 (1964)

27. HARLEY, J.D. and A.M. MAUER: Studies on the formation of Heinz bodies. II. The nature and significance of Heinz bodies.
Blood 17, 418 (1961)

28. HEINZ, R.: Morphologische Veränderungen der rothen Blutkörperchen durch Gifte.
Virchows Arch. path. Anat. 122, 112 (1890)

29. HOLLÁN, S.R. and J.H. BREUER: On red cell lipids.
Acta Med. Acad. Sci. Hung. 25, 421 (1968)

30. HÜRTER, P., W. SCHRÖTER, I. SCHEDEL and G. GERCKEN: Phospholipids of red cells and blood plasma in adults, newborn infants, and patients with Rh-erythroblastosis.
Pediatrics 46, 259 (1970)

31. IRLE, U.: Akute hämolytische Anämie durch Naphthalin-Inhalation bei zwei Frühgeborenen und einem Neugeborenen.
Dtsch. med. Wschr. 89, 1798 (1964)

32. JACOB, H.S., S.H. INGBAR and J.H. JANDL: Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasia.
J. Clin. Invest. 44, 1187 (1965)

33. JACOB, H.S., M.C. BRAIN, J.V. DACIE, R.W. CARREL and H. LEHMANN: Abnormal haem binding and globin SH group blockade in unstable haemoglobins.
Nature 218, 1214 (1968)

34. JANDL, H.J., L.K. ENGLE and D.W. ALLEN: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging.
J. Clin. Invest. 39, 1818 (1960)

35. JONES, P.E.H. and R.A. McCANCE: Enzyme activities in the blood of infants and a dults.
Biochem. J. 45, 464 (1949)

36. JUNG, R.: Über toxische Schädigungen an Erythrozyten.
Klin. Wschr. 24, 459 (1947)

37. JUNG, R.: Über Heinzsche Körperchen
Dtsch. Gesundhwes. 9, 773 (1954)

38. KLEIHAUER, E.: Denaturierung von fetalem und bleibendem Hämoglobin durch Salzsäure.
Naturw. 44, 308 (1957)

39. KLEIHAUER, E.: Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten.
Enke Verlag Stuttgart 1966

40. KLEIHAUER, E. und E. KOHNE: Unveröffentlichte Untersuchungen 1970

41. KLEIHAUER, E., H. BRAUN und K. BETKE: Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten eines Blutausstriches.
Klin. Wschr. 35, 637 (1957)

42. KLEIHAUER, E., BERNAU, A. und BETKE, K.: Unveröffentlichte Untersuchungen 1968

43. KÜNZER, W.: Zur Frage der Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten.
Folia haemat. (Lpz.) 73, 405 (1956)

44. KÜNZER, W., E. AMBS und D. SCHNEIDER: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten.
Z. Kinderheilk. 74, 652 (1954)

45. KÜNZER, W. und E. SCHÜTZ: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten. V. Mitteilung - Heinzkörperbildung an hämoglobinfreien Erythrozytenschatten.
Z. Kinderheilk. 78, 96 (1956)

46. KÜNZER, W., E. SCHÜTZ und J. BENSCH: Untersuchungen zur Heinzkörperbildung in Neugeborenenerythrozyten. VI. Mitteilung - zur Morphologie der durch Analoga mit Vitamin K-Wirkung und Vitamin C erzeugten Heinzkörper.
Z. Kinderheilk. 83, 471 (1960)

47. KUSUMOTO, S. and T. NAKAJIMA: The constitution of Heinz bodies.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 259, 266 (1967)

48. LÖHR, G.W. und H.D. WALLER: Erythrozytenfermente. In: Blutbildung und Blutumsatz beim Feten und Neugeborenen, Edit. R. Kepp u. G. Oehlert, Beiheft 159, Zeitschr. Geburtsh., p. 119, Enke Stuttgart 1962

49. LEWIN, L.: Über Hydroxylamin. Ein Beitrag zur Kenntnis der Blutgifte.
Arch. f. exper. Path. Pharmakol. 25, 306 (1889)

50. MAGOS, L. und M. SZIZA: Bildung von Heinz-Körperchen und Hämoglobinveränderungen.
Acta haemat. 22, 51 (1959)

51. MARCHAND, F.: Über die Intoxikation durch chlorsaure Salze.
Virchows Arch. f. path. Anat. 77, 455 (1879)

52. MARKS, P.A., A. GELLHORN and C. KIDSON: Lipid synthesis in human leucocytes, platelets and erythrocytes.
J. biol. Chem. 235, 2579 (1960)

53. MARTI, H.R.: Normale und anormale menschliche Hämoglobine, p. 90.
Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1963

54. MULDER, E. and L.L.M. van DEENEN: Metabolism of red cell lipids. I. Incorporation in vitro of fatty acids into phospholipids from mature erythrocytes.
Biochem. Biophys. Acta 106, 106 (1965)

55. NECHELES, T.F., T. BOLES and D.M. ALLEN: Erythrocyte glutathione peroxydase defiency and hemolytic disease of the newborn infant.
J. Pediat. 72, 319 (1968)

56. NECHELES, T.F., N. MALDONALDO, A. BARQUET-CHEDIAK and D.M. ALLEN: Hemozygous erythrocyte glutathione-peroxidase defiency: Clinical and biochemical studies.
Blood 33, 164 (1969)

57. NEERHOUT, R.C.: Erythrocyte lipids in the neonate.
Pediat. Res. 2, 172 (1968)

58. REED, C.F.: Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog.
J. clin. Invest. 47, 749 (1968)

59. RENTSCH, G.: Genesis of Heinz bodies and methemoglobin formation.
Biochem. Pharm. 17, 423 (1968)

60. RIESS, L.: Über Vergiftung mit chlorsaurem Kalium.
Berl. klin. Wschr. 19, 785 (1882)

61. RIFKIND, R.A.: Heinz body anemia: An ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction.
Blood 26, 433 (1965)

62. RITTER, R. und U. SCHULZE: Methämoglobinämie bei einem Säugling infolge Nitritvergiftung durch Kohlrabimahlzeit.
Dt. Ärztebl. 42, 3091 (1970)

63. ROTHBERG, H., L.A. CORALLO und W.H. CROSBY: Observation on Heinz bodies in normal and splenectomized rabbits.
Blood 14, 1180 (1959)

64. SCHÜTZ, E. und W. KÜNZER: Zur Lokalisierung und Morphologie von Heinzschen Körpern (Elektronenoptische Untersuchungen an Erwachsenen- und Neugeborenenerythrozyten).
Fol. haemat. N.F. 5, 1 (1961)

65. STAVE, W. und J. POHL: In: Linneweh, Die physiologische Entwicklung des Kindes.
Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg 1959

66. TJOA, G.T.: Untersuchungen über Heinzkörperbildung und Glutathionstabilität in Erythrozyten von Neugeborenen.
Z. Kinderheilk. 84, 484 (1960)

67. ULUKUTLU, L., E. KLEIHAUER and K. BETKE: The behaviour of foetal haemoglobin in the enhanced Heinz body formation in red cells of newborn infants.
Acta Paediat. Scand. 55, 473 (1966)

68. VALAES, T., S.A. DOXIADIS and P. FESSAS: Acute hemolysis du to naphthalene inhalation.
J. Pediat. 63, 904 (1963)

69. VEST, M.: Der Einfluß von Naphthohydrochinonderivaten (wasserlöslichen Vitamin-K-Ersatzpräparaten, Synkavit) auf Erythrozytenabbau und -regeneration bei Frühgeburten und auf das Glucuronidbildungsvermögen der Leber in vitro.
Schweiz. Med. Wschr. 40, 969 (1958)

70. WALLER, H.D. und G.W. LÖHR: Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Heinzkörperbildung in Erythrozyten.
Folia haemat., N. F. 8, 1 (1963)

71. WEBSTER, S.H.: Heinzbody phenomenon in erythrocytes.
Blood 4, 479 (1949)

72. WILLI, H.: Innenkörperbildung durch Elkosin und spontane Innenkörperbildung.
Schweiz. med. Wschr. 77, 243 (1947)

73. WILLI, H. und F. HARTMEIER: Spontane Innenkörperbildung bei Neugeborenen.
Schweiz. med. Wschr. 1950, 1091

74. WOLPERS, C.: Zur Feinstruktur der Erythrozytenmembran.
Naturwissenschaften 29, 416 (1941)

75. ZINKHAM, W.H.: An in vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborns: Mechanism and clinical significance.
Pediatrics 23, 18 (1959)

Herrn Professor Dr. E. Kleihauer (Ulm) danke ich für die stets gern und schnell gewährte Hilfe bei der Abfassung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 22. Juli 1940 wurde ich, Andreas Bernau, als erster Sohn des Pfarrers Dr. Heinz Bernau und seiner Ehefrau Christine, geborene Kausch, in Walsleben in der Altmark geboren. Die Grundschule besuchte ich in Salzwedel. 1952 kam ich auf das Evangelische Gymnasium zum Grauen Kloster in Berlin, an dem ich 1961 das Abitur bestand. Anschließend begann ich in Münster mein Medizinstudium. Nach dem 1965 dort abgelegten Physikum wechselte ich an die Universität Tübingen. Hier beendete ich im Februar 1969 mein Studium mit dem Staatsexamen.